

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

**Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.**

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt, seine Herstellung
und Verwendung zur Behandlung von Herzerkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung und die Verwendung zur gentherapeutischen Behandlung von Herzerkrankungen.

Das Krankheitsbild der Kardiomyopathie umfaßt eine Gruppe von Herzmuskelerkrankungen, welche sich sowohl in kontraktilen als auch in elektrophysiologischen Störungen zeigen und letztlich zur schweren Herzinsuffizienz und/oder zum plötzlichen, elektrophysiologischen Herztod führen. Die Suche nach monogenetischen Ursachen bei familiären Formen der dilatativen und hypertrophen Kardiomyopathie ist derzeit Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. So konnten gerade in jüngster Zeit genetische Ursachen für Herzmuskelerkrankungen auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Beispielsweise verursacht die sogenannte Duchenne Muskeldystrophie (DMD) auch eine Kardiomyopathie. DMD ist eine Erbkrankheit, die durch Mutationen und Deletionen im Dystrophingen verursacht wird. Das Dystrophingen ist auf dem

X-Chromosom lokalisiert und wird beim gesunden Menschen u. a. in Herzmuskelzellen exprimiert. Ferner wurde gefunden, daß bei dem chronisch congestiven Herzfehler (CHF) das Myokard 50% weniger an β -adrenergischem Rezeptor enthält als gesundes Myokard.

Nach der Identifizierung genetischer Defekte oder dem Nachweis einer veränderten Genexpression in erkrankten Herzmuskelgeweben ergibt sich daher die Möglichkeit, die Krankheiten mittels molekularbiologischer Methoden zu heilen. So stellt beispielsweise der somatische Gentransfer eine vielversprechende Methode dar, genetisch bedingte Herzmuskelerkrankungen zu behandeln.

Für den somatischen Gentransfer eignen sich verschiedene Methoden, wie z. B. der Gentransfer durch Injektion von DNA, der Liposomen-unterstützte Gentransfer oder der Gentransfer mittels retroviraler, adenoviraler oder adeno-assoziiierter Vektoren. Wesentliche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Gentherapie sind eine hohe Übertragungsrate, eine stabile Genexpression und vor allem die Gewebespezifität.

In der WO94/11506 wird der erfolgreiche Gentransfer und die erfolgreiche Expression eines Gens kodierend für die β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors sowohl in glatten Muskelzellen der Koronargefäße als auch in Herzmuskelzellen gezeigt. Eine Herzmuskel-spezifische Expression konnte jedoch nicht erreicht werden. In der Beschreibung wird zwar allgemein auf den Herzmuskel-spezifischen Troponin C (cTNC) Promotor hingewiesen, ohne jedoch eine herzspezifische in vivo Expression zu zeigen.

Aus Franz, W.-M. et al. (1994) Cardioscience, 5, 235-243, No. 4 ist bekannt, daß die Mikroinjektion einer nackten DNA eines Myosin-Leichte-Ketten-2(MLC-2)-Promotor-Luciferase-Fusionsgens in den männlichen Pronukleus von fertilisierten Mausoozyten eine transgene Maus erzeugt, die eine Herzmuskel-spezifische Expression des Luciferasegens besitzt.

Myosin, eine Hauptkomponente des Herzmuskels und anderer gestreifter Muskeln, besteht aus zwei schweren Ketten (MHC) und zwei Paaren von Myosin-Leichte-Ketten (MLC). Die MLC teilen sich wiederum in eine nicht-phosphorylierbare (MLC-1) und eine phosphorylierbare (MLC-2) Form. Es wurde nun gefunden, daß die regulatorische Nukleinsäuresequenz (Promotor) am 5'-Ende der MLC-2 Gene der Skelettmuskel und der Herzmuskel der Ratte unterschiedlich sind, jedoch der MLC-2 Gene der Herzmuskel der Ratte und des Huhns konserviert sind, obwohl die Ratte und das Huhn evolutionär weit getrennt sind (Henderson, S. A. et al. (1989) J. Biol. Chem., 264, 18142-18148). Lee et al. (Lee, K. J. et al. (1994) Mol. Cell. Biol., 14, 1220-1229, No. 2) fanden nun anhand von transgenen Mäusen, daß eine Kombination von positiven (HF-1a und HF-1b) und negativen (E-Box und HF-3) regulatorischen Elementen, die innerhalb von 250 Basenpaaren stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegen, eine Ventrikelkammer-spezifische Expression verursacht, obwohl ein Erhalt der Spezifität bei einer gentherapeutischen in vivo Applikation bis heute nicht gezeigt werden konnte. Franz, W.-M. et al. (1994), supra fanden jedoch ebenso anhand von transgenen Mäusen, daß für die Herzmuskel-spezifische Expression eine weitere regulatorische Sequenz, die sogenannte herzspezifische Sequenz (CSS), ein ca. 1700 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegendes Repressorelement, notwendig ist. Aus diesen Ergebnissen erkennt man, daß der Mechanismus zur Herz-spezifischen Expression von Genen noch nicht geklärt ist und eine Herz-spezifische Expression eines Gens nach in vivo Applikation des Gens noch nicht gefunden wurde.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Nukleinsäurekonstrukt zu finden, das für die Gentherapie von Herzerkrankungen eine hohe Übertragungsrate, eine stabile Genexpression und vor allem eine Spezifität für Herzmuskelzellen besitzt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, vorzugsweise des Herzens eines Säugetiers, insbesondere vom Menschen oder von einem Nager, vor allem von der Ratte, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert.

Als regulatorische Nukleinsäuresequenz im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man im allgemeinen die stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (+1) des MLC-2 Gens gelegene Nukleinsäuresequenz, die die Transkription einer mit dieser Sequenz am 3'-Ende verbundenen, stromabwärts liegenden Nukleinsäuresequenz insbesondere bezüglich des korrekten Transkriptionsstartes, der Transkriptionsrate und/oder der Herzmuskel-Gewebespezifität kontrolliert, d.h. die regulatorische Nukleinsäuresequenz ist mit der stromabwärts liegenden Nukleinsäuresequenz funktionell verbunden. Die Sequenz von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -800 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des MLC-2 Gens des Herzens ist besonders bevorzugt (siehe Abb. 10), da es besonders überraschend war, daß ungefähr 800 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt ausreichend sind, um bei einer in vivo Applikation eine Herz-spezifische und insbesondere eine Herzkammer-spezifische Expression zu bewirken, obwohl diese Sequenz die sogenannte herzspezifische Sequenz CSS nicht enthält. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist auch eine Sequenz von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1600 und insbesondere von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1800, vor allem von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2100 oder von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2700 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des MLC-2 Gens des Herzens (siehe Abb. 10). Die regulatorische Nukleinsäuresequenz enthält vor allem ein oder mehrere regulatorische Elemente ausgewählt aus TATA-Box, HF-1a, HF-1b, HF-2, HF-3, E-Box, MLE1 und/oder CSS-Sequenz,

insbesondere ausgewählt aus TATA-Box, HF-1a, HF-1b, HF-2, HF-3, E-Box und/oder MLE1. Beispielsweise liegt bei einer regulatorischen Nukleinsäuresequenz der Ratte die TATA-Box ungefähr zwischen -198 und -19, das HF-1 Element, eine konservierte 28 Basen lange Sequenz, ungefähr zwischen -72 und -45 und insbesondere das HF-1a Element ungefähr zwischen -57 und -65 und das HF-1b Element ungefähr zwischen -45 und -56, das HF-2 Element ungefähr zwischen -123 und -134, das HF-3 Element ungefähr zwischen -186 und -198, das E-Box Element ungefähr zwischen -72 und -77, das MLE1 Element ungefähr zwischen -165 und -176 und das CSS-ähnliche Element ungefähr zwischen -1723 und -1686 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des MLC-2 Gens (siehe Abb. 10). Bei dem MLC-2 Gen der Ratte liegen die regulatorischen Sequenzen TATA-Box, HF-1b Element, HF-1a Element, E-Box Element, HF-2 Element, MLE1 Element und HF-3 Element in dieser Reihenfolge innerhalb der ersten 200 Basen stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des Gens (siehe Abb. 10).

Für die herzspezifische Expression ist es bevorzugt, wenn das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt das HF-1a Element, das HF-1b Element, das MLE1 Element und das HF-3 Element, vorzugsweise zusammen mit dem E-Box Element, insbesondere zusammen mit dem E-Box Element und/oder HF-2 Element, enthält. In jedem Fall ist es ebenso bevorzugt, wenn das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich die herzspezifische Sequenz CSS enthält.

Unter einem gentherapeutischen Nukleinsäurekonstrukt im Sinne dieser Erfindung versteht man ein Nukleinsäurekonstrukt mit einer Nukleinsäuresequenz, die insbesondere eine DNA- oder RNA-Sequenz, vorzugsweise eine einzelsträngige oder doppelsträngige, vor allem eine doppelsträngige DNA-Sequenz ist, wobei das Nukleinsäurekonstrukt als Arzneimittel für die gentherapeutische Behandlung von Herzerkrankungen, insbesondere zur Behandlung von Herzinsuffizienz, dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie, Dystrophinopathie, Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose

oder Restenose der Blutgefäße in vorteilhafterweise verwendet werden kann.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt wird vorzugsweise mit einem Virusvektor und/oder mit Liposomen kombiniert, vorzugsweise mit einem Adenovirusvektor, vor allem mit einem replikationsdefizienten Adenovirusvektor, oder mit einem Adeno-assoziierten Virusvektor, vor allem mit einem Adeno-assoziierten Virusvektor, der ausschließlich aus zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht, ligiert. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die gentechnische Verbindung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes mit einem Adenovirusvektor, vor allem mit einem replikationsdefizienten Adenovirusvektor.

Ein Adenovirusvektor und insbesondere ein replikationsdefizienter Adenovirusvektor sind aus den folgenden Gründen besonders bevorzugt:

Das humane Adenovirus gehört zu der Klasse der doppelsträngigen DNA-Viren mit einem Genom von ca. 36 Kilobasenpaaren (Kb). Die virale DNA kodiert für etwa 2700 verschiedene Genprodukte, wobei man frühe ("early genes") und späte ("late genes") Genprodukte in bezug auf den adenoviralen Replikationszyklus unterscheidet. Die "early genes" werden in vier transkriptionelle Einheiten, E1 bis E4, unterteilt. Die späten Genprodukte kodieren für die Kapsidproteine. Immunologisch können mindestens 42 verschiedene Adenoviren und die Untergruppen A-F unterschieden werden, die alle für die vorliegende Erfindung geeignet sind. Die Transkription der viralen Gene setzt die Expression der E1 Region voraus, welche für einen Transaktivator der adenoviralen Genexpression kodiert. Diese Abhängigkeit der Expression aller nachfolgenden viralen Gene von dem E1-Transaktivator kann für die Konstruktion der nicht replikationsfähigen adenoviralen Vektoren genutzt werden (siehe z. B. McGrory, W. J. et al. (1988) Virol. 163, 614-617 und Gluzman, Y. et al. (1982) in "Eukaryotic Viral

Vectors (Gluzman, Y. ed) 187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). In adenoviralen Vektoren, insbesondere vom Typ 5 (Sequenz siehe Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280-285) und vor allem von der Untergruppe C, wird im allgemeinen die E1-Genregion durch ein Fremdgen mit eigenem Promotor bzw. durch das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt ersetzt. Durch den Austausch der E1-Genregion, welche für die Expression der nachgeschalteten adenoviralen Gene Voraussetzung ist, entsteht ein nicht replikationsfähiges Adenovirus. Diese Viren können sich dann nur in einer Zelllinie vermehren, welche die fehlenden E1 Gene ersetzt.

Replikationsdefiziente Adenoviren werden daher im allgemeinen durch homologe Rekombination in der sogenannten 293 Zelllinie (humane embryonale Nierenzelllinie), die eine Kopie der E1 Region stabil im Genom integriert hat, gebildet. Hierzu werden unter Kontrolle eines eigenen Promotors (z.B. des mlc-2 Promotors gemäß der vorliegenden Erfindung) eine Nukleinsäuresequenz (z.B. die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt gemäß der vorliegenden Erfindung oder für einen Marker, z. B. β -Galaktosidase/ β -Gal) in rekombinante adenovirale Plasmide kloniert. Anschließend erfolgt die homologe Rekombination beispielsweise zwischen den Plasmiden pAd.mlc-2/ β -Gal und einem E1-defizienten adenoviralen Genom wie z. B. d1327 oder del324 (Adenovirus 5) in der Helferzelllinie 293. Bei erfolgreicher Rekombination werden virale Plaques geerntet. Die so erzeugten replikationsdefizienten Viren werden dann in hohen Titern (beispielsweise 10^9 bis 10^{11} "plaque forming units" oder Plaque bildende Einheiten) zur Infektion der Zellkultur oder für die somatische Gentherapie eingesetzt.

Im allgemeinen ist die genaue Insertionsstelle der Fremd-DNA in das adenovirale Genom nicht kritisch. Es ist z. B. auch möglich die Fremd-DNA an die Stelle des deletierten E3 Gens zu klonieren (Karlsson, S. et al. EMBO J. 1986, 5, 2377-2385). Vorzugsweise wird jedoch die E1 Region oder Teile

davon, z. B. die E1A oder E1B Region (siehe z. B. WO95/00655) durch die Fremd-DNA ersetzt, vor allem wenn auch die E3 Region deletiert ist.

Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf das adenovirale Vektorsystem beschränkt, sondern auch Adeno-assoziierte Virusvektoren eignen sich in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt aus folgenden Gründen in besonderer Weise:

Das AAV Virus gehört zur Familie der Parvoviren. Diese zeichnen sich durch ein ikosaedrisches, unbehülltes Kapsid mit einem Durchmesser von 18-30 nm aus, welches eine lineare, einzelsträngige DNA von ca. 5 kb enthält. Für eine effiziente Vermehrung von AAV ist eine Koinfektion der Wirtszelle mit Helferviren erforderlich. Als Helfer eignen sich beispielsweise Adenoviren (Ad5 oder Ad2), Herpesviren und Vacciniaviren (Muzyczka, N. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158, 97-129). In Abwesenheit eines Helfervirus geht AAV in einen Latenzzustand über, wobei das Virusgenom in der Lage ist, stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren. Die Eigenschaft von AAV in das Wirtsgenom zu integrieren macht es als Transduktionsvektor für Säugertierzellen besonders interessant. Für die Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR: inverted terminal repeats; siehe z. B. WO95/23867). Sie tragen die in "cis" notwendigen Signale für Replikation, Verpackung und Integration in das Wirtszellgenom. Zur Verpackung in rekombinante Vektorpartikel wird ein Vektorplasmid, welches die Gene für nicht-strukturelle Proteine (rep-Proteine) und für strukturelle Proteine (cap-Proteine) trägt, in Adenovirus-infizierte Zellen transfiziert. Nach einigen Tagen wird ein zellfreies Lysat hergestellt, welches neben den rekombinanten AAV Partikeln auch Adenoviren enthält. Die Adenoviren können vorteilhafterweise durch Erhitzen auf 56°C oder durch Bandieren im Cäsiumchlorid-Gradienten entfernt werden. Mit dieser Cotransfektionsmethode sind rAAV Titer von 10^5 - 10^6

IE/ml erzielbar. Die Kontamination durch Wildtyp Viren liegt unterhalb der Nachweisgrenze, wenn das Verpackungsplasmid und das Vektorplasmid keine überlappenden Sequenzen besitzen (Samulski, R. J. (1989) J. Virol. 63, 3822-3828).

Der Transfer von Fremdgenen in somatische Körperzellen kann durch AAV in ruhende, differenzierte Zellen erfolgen, was für die Gentherapie des Herzens besonders vorteilhaft ist. Durch die erwähnte Integrationsfähigkeit kann auch eine lang anhaltende Genexpression in vivo gewährleistet werden, was wiederum besonders vorteilhaft ist. Ein weiterer Vorteil von AAV ist, daß das Virus nicht pathogen für den Menschen und relativ stabil in vivo ist. Die Klonierung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes in den AAV-Vektor oder Teilen davon erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, wie sie z. B. in der WO95/23867, bei Chiorini, J. A. et al. (1995) Human Gene Therapy 6, 1531-1541 oder Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5, 793-801 beschrieben sind.

Eine weitere vorteilhafte Kombination im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Komplexierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte mit Liposomen, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz insbesondere von Herzmuskelzellen erreicht werden kann (Felgner, P. L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417). Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr, J. P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986; Felgner, J. H. et

al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550-2561; Gao, X. & Huang, L. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 280-285; Zhou, X. & Huang, L. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195-203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Ein Beispiel für die Herstellung von DNA-Liposomenkomplexen und deren erfolgreiche Anwendung in der Herz-spezifischen Transfektion ist in der DE 44 11 402 beschrieben.

Als therapeutisches Genprodukt eignen sich beispielsweise Dystrophin, der β -adrenergische Rezeptor, die Stickstoffmonoxid-Synthase oder jedes andere Genprodukt, das z.B. einen monogenetischen Fehler komplementiert, elektrophysiologische Störungen verhindert bzw. verringert oder andere herzspezifische Krankheiten mildern bzw. heilen kann. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn das Gen, das für das therapeutische Genprodukt kodiert (Transgen), ein oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Transgens, und/oder eine polyA Sequenz vor allem am 3'-Ende des Transgens, beispielsweise die endogene polyA Sequenz des jeweiligen Gens, vorzugsweise eine SV40 Virus polyA Sequenz, enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA in der Herzmuskelzelle erreicht werden kann (Jackson, R. J. (1993) Cell 74, 9-14 und Palmiter, R. D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 478-482).

Die mit der regulatorischen Nukleinsäure des MLC-2 Gens funktionell verbundene Nukleinsäure kann jedoch nicht nur eine Nukleinsäure, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt kodiert, sein, sondern auch eine Nukleinsäure, die für eine "antisense" Nukleinsäure, vorzugsweise ein "antisense" Oligonukleotid, insbesondere ein "antisense" DNA-Oligonukleotid oder für ein Ribozym kodiert. Sowohl durch "antisense" Oligonukleotide als auch durch Ribozyme kann die Expression von Genen im Herzen spezifisch verringert bzw.

verhindert werden, wodurch eine Vielzahl von Herzspezifischen Erkrankungen, wie z. B. die Arteriosklerose oder die Restenose, aber auch Autoimmun- oder Krebserkrankungen behandelt werden können (siehe z. B. Barr, E. & Leiden, J. M. (1994) Trends Cardiovasc. Med. 4, 57-63, No. 2 und Bertrand, E. et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 293-300).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes, wobei die oben näher beschriebene regulatorische Nukleinsäuresequenz funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden wird, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die genannte regulatorische Nukleinsäure und die Nukleinsäure, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert, entweder gleichzeitig oder hintereinander in einen der oben näher beschriebenen Virusvektoren kloniert.

Das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten gentechnischen Methoden (siehe z. B. Maniatis et al. (1982) Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory New York). Die Protein- bzw. Nukleinsäuresequenzen der therapeutisch wirksamen Genprodukte sind beispielsweise über die EMBL Genbank oder jede andere öffentlich zugängliche Genbank erhältlich. Die Sequenz des MLC-2 Gens des Herzens der Ratte ist aus Henderson, S. A. et al. (1989), supra bekannt und die regulatorische Nukleinsäuresequenz des MLC-2 Gens kann der Abb. 10 entnommen werden. Ausgehend von diesen Sequenzen und der bei Henderson, S. A. et al. (1989), supra beschriebenen Methode zur Isolierung des MLC-2 Gens einschließlich der regulatorischen Sequenzen aus einer genomischen Genbank lassen sich ohne weiteres auch zu dem Rattengen homologe Sequenzen aus anderen Tieren oder dem Menschen finden. Insbesondere ist es möglich weitere regulatorische Sequenzen des MLC-2 Gens des Herzens in genomischen Genbanken anderer

Tiere oder des Menschen ohne unzumutbaren Aufwand zu isolieren, da, wie oben bereits erwähnt, die am 5'-Ende gelegenen regulatorischen Nukleinsäuresequenzen des MLC-2 Gens des Herzens sogar zwischen evolutionär weit entfernter Tierarten, wie z. B. der Ratte und dem Huhn, im wesentlichen konserviert sind (Henderson, S. A. et al. (1989), supra).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, bei dem das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt mit Liposomen, wie z.B. in DE 44 11 402 näher beschrieben, komplexiert wird.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes zur gentherapeutischen Behandlung einer Herzerkrankung bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur gentherapeutischen Behandlung einer Herzerkrankung, wobei es sich bei der Herzerkrankung vorzugsweise um die Herzinsuffizienz, dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie, Dystrophinopathie, Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose und/oder Restenose der Blutgefäße handelt. Insbesondere ist es vorteilhaft, wenn das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt im wesentlichen in der Herzkammer (Ventrikel) wirkt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Arzneimittel enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt und gegebenenfalls einen pharmazeutischen Träger, der beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ungefähr 6,0 bis ungefähr 8,0, vor allem von ungefähr 6,8 bis ungefähr 7,8, insbesondere ungefähr 7,4 und/oder einer Osmolarität von ungefähr 200 bis ungefähr 400 milliosmols pro Liter (mosm/L), vorzugsweise von ungefähr 290 bis ungefähr 310 mosm/L enthält. Daneben kann der pharmazeutische Träger auch noch geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe enthalten.

Die Applikation der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte gegebenenfalls in Kombination mit den oben beschriebenen Virusvektoren oder Liposomen erfolgt im allgemeinen intravenös (i. v.), z. B. mit Hilfe eines Katheters. Vorteilhaft ist beispielsweise die direkte Infusion des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes, vor allem in Form rekombinanter Adenoviren, in die Koronararterien des Patienten ("Percutaneous Coronary Gene Transfer", PCGT). Insbesondere ist die Applikation der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, vor allem in Form rekombinanter Adenoviren mit Hilfe eines Ballonkatheters, wie z. B. bei Feldman et al. (Feldman, L. J. et al. (1994) JACC 235A, 906-34) beschrieben, bevorzugt, da hierdurch die Transfektion nicht nur auf das Herz, sondern auch innerhalb des Herzens auf die Injektionsstelle begrenzt werden kann.

Die unerwarteten Vorteile der vorliegenden Erfindung liegen darin, daß das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt bei der gentherapeutischen Behandlung von Herzerkrankungen eine hohe Übertragungsrate zeigt, in den transfizierten Zellen stabil und exprimierbar ist und vor allem seine Spezifität für Herzmuskelzellen nicht verliert. Dies ist deshalb so überraschend, weil z. B. der smmhc-Promotor seine Spezifität für neonatale und adulte glatte Muskelzellen verliert (siehe Beispiel 6 unten) und ein bevorzugter mlc-2 Promotor des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes, der die herzspezifische Sequenz CSS nicht enthält, seine Spezifität insbesondere in Verbindung mit einem Adenovirusvektor behält. Unter Spezifität im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man daher, daß die mlc-2 Promotor-kontrollierte Expression in Kardiomyozyten, insbesondere im Ventrikel, deutlich höher ist als beispielsweise die mlc-2 Promotor-kontrollierte Expression in Gefäßmuskelzellen, vor allem daß der Unterschied in der Expression ungefähr ein bis ungefähr drei, insbesondere ungefähr drei bis ungefähr sechs, vor allem ungefähr drei bis ungefähr vier Zehnerpotenzen beträgt.

Es war auch überraschend, daß der *mlc-2* Promotor die Expression der Luciferase wesentlich stärker auf das Herz beschränkt als der α *mhc*-Promotor (siehe Beispiel 10 unten). Von besonderem Vorteil ist auch, daß mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt die herzspezifische Expression nach in vivo Applikation auf die Herzkammer (Ventrikel) beschränkt ist (siehe Beispiel 11 unten), da es hierdurch beispielsweise möglich ist, die Kontraktionskraft des Ventrikels zu steigern.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern ohne sie darauf zu beschränken.

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der konstruierten Plasmide *pAd-Luc*, *pAd-rsvLuc*, *pAd-mlcLuc* und *pAd-smmhcLuc*. *Bam*HI, *Kpn*I und *Hind*III bezeichnen die Restriktionsenzym-schnittstellen der entsprechenden Enzyme. ITR bedeutet "Inverted Terminal Repeat", Ψ die Verpackungssequenz, *mlc-2* der "myosin light chain"-2v-Promotor, Luciferase die Luciferase-kodierende Sequenz, Ad 9.4-18 m.u. die adenovirale Sequenz von 9.4 bis 18 "map units" (1 m. u. = 360 bp) von Adenovirus Typ 5 und *ori/ampR* den "origin of replication" und das Ampicillin-Resistenzgen.

Abb. 2 zeigt die durch homologe Rekombination erhaltenen rekombinanten Adenoviren, die vom Adenovirus del324 abstammen, wobei das Luciferasegen in die ehemalige E1 Region kloniert wurde. Die Expression des Luciferasegens wird entweder durch den *smmhc*-Promotor (*Ad-smmhcLuc*), der für die glatte Gefäßmuskulatur spezifisch ist, den *mlc-2v*-Promotor (*Ad-mlcLuc*) für die Herzmuskel-spezifische Expression, durch den RSV Promotor (*Ad-rsvLuc*) als Positivkontrolle oder durch keinen Promotor (*Ad-Luc*) als Negativkontrolle kontrolliert. Die Abkürzungen sind analog Abb. 1.

Abb. 3A-C zeigen schematische Darstellungen der Luciferaseaktivitäten von Ad-Luc, Ad-rsvLuc Ad-mlcLuc und Ad-smmhLuc in verschiedenen Zelllinien. Der dünne Strich auf jeder Säule stellt die mittlere Standardabweichung dar.

Abb. 4A-C zeigen schematische Darstellungen der Luciferaseaktivitäten von Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in verschiedenen primären Zellgeweben. Der dünne Strich auf jeder Säule stellt die mittlere Standardabweichung der Experimente dar.

Abb. 5A-C zeigen die schematische Darstellungen der Luciferaseaktivität von Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in verschiedenen Geweben nach Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten. Der dünne Strich auf jeder Säule stellt die mittlere Standardabweichung der Experimente dar.

Abb. 6A und B zeigen den histologischen Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität im Myokard nach intrakavitärer Injektion des rekombinanten Adenovirus AD.RSV β gal. Abb. 6A stellt eine Photographie eines histologischen Schnittes durch den Apex (Injektionsstelle) dar. Abb. 6B stellt die Photographie eines histologischen Schnittes durch den linken Ventrikel dar. Der Balken entspricht 100 μ m.

Abb. 7A-C zeigen den Nachweis adenoviraler DNA in 12 verschiedenen Geweben nach intrakavitärer Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc.

Abb. 7A zeigt eine Photographie eines 2,4%igen Agarosegels mit dem spezifischen 860 bp PCR Produkt, das durch Amplifikation von abnehmenden Mengen Addel324 DNA erzeugt wurde. Als Probe wurden 100 ng genomische DNA der Ratte gemischt mit Addel324 DNA eingesetzt: Spur 1: 10 pg; Spur 2: 1 pg; Spur 3: 100 fg; Spur 4: 10 fg; Spur 5: 1 fg; Spur 6; 0,1 fg; Spur 7: keine virale DNA. M entspricht einem DNA-Marker (100 bp Leiter).

Abb. 7B zeigt eine Photographie eines 2,4%igen Agarosegels mit dem spezifischen 860 bp PCR-Produkt, amplifiziert aus 100 ng genomischer DNA, welche aus den angegebenen Geweben nach intrakavitärer Injektion von Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc isoliert worden war. Ein PCR Ansatz mit 100 ng genomischer DNA der Ratte gemischt mit 1 pg Addel324 DNA diente als Positivkontrolle, ein Ansatz ohne Addel324 DNA als Negativkontrolle.

Abb. 7C zeigt einen Southern-Blot des Ad-mlcLuc infizierten Tieres gemäß Abb. 7B. Als Sonde wurde das ³²P-markierte 860 bp PCR Produkt aus einem Kontrollansatz verwendet.

Abb. 8A und B zeigen die Luciferaseaktivitäten der rekombinanten Adenoviren Ad- α mhcLuc (Abb. 8A) und Ad-mlcLuc (Abb. 8B) nach intrakavitärer Injektion in die linke Hauptkammer neonataler Ratten in verschiedenen Geweben.

Abb. 9A-C zeigen die Luciferaseaktivitäten der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, Ad- α mhcLuc und Ad-Luc im Atrium (Abb. 9A) und im Ventrikel (Abb. 9B). Das Verhältnis der Aktivitäten im Atrium und im Ventrikel zeigt Abb. 9C. Die Säulen zeigen den Median von vier Experimenten, wobei die Punkte die Ergebnisse für die jeweiligen Versuchstiere bzw. das Verhältnis der Luciferaseaktivität im Ventrikel zum Vorhof repräsentieren.

Abb. 10A-C zeigen die Nukleinsäuresequenz eines 2216 Basenpaar-langen stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (+1) gelegenen Promotors des MLC-2v Gens der Ratte. Die Nukleinsäuren von Position 1-156 kodieren für die Verpackungssequenz Ψ des Adenovirus Ad5 (Position 300-456). Die Klonierungssequenz für die Restriktionsendonuklease BamHI befindet sich an Position 158-163 und für KpnI an der Position 189-194. Von Position 189-2405 befindet sich der 2216 Basenpaar-lange Promotor des MLC-2v Gens. Die CSS-ähnliche Sequenz befindet sich an der Position 682-724, das

HF-3 Element an der Position 2207-2219, das MLE1 Element an der Position 2229-2241, das HF-2 Element an der Position 2271-2289, das E-Box Element an der Position 2328-2333, das HF-1a Element an der Position 2340-2348, das HF-1b Element an der Position 2349-2361 und der Transkriptionsstart (+1) an der Position 2406. Die Luciferase-kodierende Sequenz beginnt bei Position 2461. An der Position 1660-2406 liegt die 746 Basenpaar-lange regulatorische Sequenz des Plasmids pAd-mlcLuc (siehe Beispiel 1).

Beispiele

1. Herstellung der rekombinanten Plasmide pAD-Luc, pAd-rsvLuc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhLuc und pAd α mhcLuc

Die Plasmide pAD-Luc, pAD-rsvLuc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhLuc (Abb. 1) und pAd α mhcLuc sind Derivate des Plasmids pAd.RSV β gal (Stratford-Perricaudet, L. D., J. (1992) Clin. Invest. 90, 626-630), in dem die BamHI-KpnI RSV- β gal-Kassette ("Rous Sarcoma Virus"-Promotor und β -Galaktosidase-Reportergen) gegen die Luciferase cDNA mit ihrem endogenen Polyadenylierungssignal entweder ohne Promotor (pAD-Luc), mit dem RSV-Promotor (pAD-RSV-Luc), dem mlc-2v-Promotor (pAd-mlcLuc), dem "smooth muscle myosin heavy chain"-Promotor (pAd-smmhLuc) oder dem " α -myosin heavy chain"-Promotor (pAd α mhcLuc) ausgetauscht ist. Hierfür wurde das HindIII/KpnI Fragment des Plasmids pSVOAL, welches für das Luciferasegen kodiert, 5' in die HindIII/KpnI Klonierungsschnittstellen des Vektors pBluescriptSK (Stratagene) subkloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-Luc erzeugt (Wet, J. R. et al. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 725-735). Das BamHI/KpnI Luciferasefragment des Subklons pBluescript-Luc wurde anschließend in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAD.RSV- β gal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-Luc erzeugt.

Für die Klonierung des Plasmids pAD-rsvLuc wurde das BamHI/HindIII RSV-Fragment (587 bp) des Plasmids pAD.RSV- β gal in die BamHI/HindIII Schnittstellen des Subklons pBluescript-Luc kloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-RSV-Luc erzeugt. Anschließend wurde das BamHI/KpnI RSV-Luciferase-Fragment des Plasmids pBluescript-RSV-Luc in die BamHI/KpnI Schnittstellen von pAd.RSV- β gal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-rsvLuc erzeugt.

Zur Herstellung des Plasmids pAD-mlcLuc wurde das BamHI/KpnI mlc-Luciferasefragment (746 Basenpaar-langer "myosin light chain"-2v-Promotor gemäß Abb. 10 und 1.8 kb Luciferasegen) aus dem Plasmid pMLCL Δ 5' direkt in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd-RSV β gal kloniert (Henderson, S. A. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 18142-18148). Hierzu wurde das mlc-2/Luciferase Fusionskonstrukt an den Restriktionsenzymchnittstellen KpnI herausgeschnitten, die überhängenden Enden in einer sogenannten "Klenow-Reaktion" aufgefüllt und an beiden Enden PvuII-Linker ligiert. Anschließend wurde das 4,0 kb lange mlc-2/Luciferase-DNA Fragment in Analogie zu dem rekombinanten Plasmid pAd.RSV β gal in die PvuII-Schnittstelle am 3'-Ende der 1,3 m.u. Region des Adenovirus Typ 5 (Ad 5) Genoms gekoppelt.

Zur Herstellung des Plasmids pAd-smmhcLuc wurde das 1,2 kb große BamHI/HindIII smmhc-Fragment (Kaninchen "smooth muscle myosin heavy chain" Promotor/-1225/-4) aus dem Plasmid pRBSMHC-1225 β gal (Kallmeier, R.C. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 30949-30957) isoliert und in den BamHI/HindIII geöffneten Subklon pBluescript-Luc vor das Luciferasegen kloniert und dadurch der Subklon p1.2smmhcBluescript-Luc konstruiert. Das BamHI/KpnI smmhc-Luciferase-Fragment dieses Subklons wurde anschließend in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd-RSV β gal kloniert und das Plasmid pAd-smmhcLuc erzeugt.

Die Herstellung des Plasmids pAd- α mhLuc, das den " α -myosin heavy chain"-Promotor enthält (Subramaniam, A. et al. (1991)

J. Biol. Chem., 266, 24613-24620), wurde ein 1064 bp großes BamHI/HindIII Fragment in die BamHI/HindIII Schnittstellen des Plasmids pBluescript-Luc kloniert. Anschließend wurde daraus ein BamHI/KpnI mhc-Luciferase Fragment in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd.RSV- β gal kloniert und dadurch das Plasmid pAD- α mhcLuc erhalten.

2. Herstellung der rekombinanten Adenoviren

Die rekombinanten Adenoviren wurden nach Standardmethoden durch homologe Rekombination zwischen den Plasmiden pAd-Luc, pAd-rsvLuc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhcLuc und pAd- α mhcLuc und der genomischen DNA von Adenovirus del324 (Ad5) in 293-Zellen in vivo erzeugt (Thimmappaya, B. et al. (1982) Cell 31, 543-551 und Stradtford-Perricaudet, L. D. et al. (1992), supra und Graham, F. L. et al. (1977) J. Gen. Virol. 36, 59-74). Die rekombinanten Adenoviren besitzen eine Deletion in der E3 Region und die Transgene Luc, RSV-Luc, mlcLuc, pAd-smmhcLuc und pAd- α mhcLuc substituieren die E1 Region. Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^6 293-Zellen in eine kleine Zellkulturschale ausplattiert. 5 μ g des großen ClaI-Fragments der genomischen DNA von Ad5 wurden zusammen mit 5 μ g der AatII linearisierten Plasmide pAd-Luc, pAd-RSV-Luc, pAd-mlcLuc, pAd-smmhcLuc und pAd- α mhcLuc nach der Kalziumphosphatmethode in 293-Zellen kotransfiziert. Nach Überschichten mit Weichagar (1% SeaPlaque Agarose, 1xMEM, 2% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 μ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) und 8-10 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden virale Plaques ausgestanzt und auf 293-Zellen klonal vermehrt. Aus 2×10^6 vollständig infizierten 293-Zellen wurde die virale DNA der rekombinanten Viren isoliert und durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen auf die korrekte Integration des Transgens untersucht. Von den positiven viralen Klonen wurde erneut eine Einzelplaquereinigung durchgeführt bevor sie in 293-Zellen für eine Großaufarbeitung vermehrt und durch zweimalige Caesium-Chlorid-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt wurden.

(Stradtford-Perricaudet, L. D., 1992, supra). Schließlich wurden die Viren gegen TD-Puffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerin, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) dialysiert und bei -72°C eingefroren. Zur Bestimmung der Titer der rekombinanten Adenoviren wurde der "Plaque Assay" unter Verwendung von 293-Zellen durchgeführt. Alle rekombinanten Adenoviren hatten einen Titer von etwa 10¹¹ "plaque forming units" (p.f.u.)/ml. Die DNA der viralen Stammlösungen wurde isoliert und durch eine Analyse mittels Restriktionsendonukleasen und PCR auf die korrekte Integration der Inserts untersucht. Ferner wurden die viralen Stammlösungen mittels PCR auf dem Wildtyp Ad-5 untersucht, wobei in 50 ng der adenoviralen DNA keine Kontamination nachweisbar war (Zang, W. W. et al. (1995) BioTechniques 18, 444-447).

3. Luciferase-Bestimmung

Für die in vitro Studien wurden die Zellen 48 Stunden nach der Infektion geerntet. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität in Proteinextrakten nach etablierten Protokollen mittels Transilluminometer Lumat LB 9501 (Bertold, Wildbad) bestimmt (Ausubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology. Greene and Wiley, New York). Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach Bradford (1976) bestimmt (BioRad, München). Die Luciferaseaktivität wurde in pg Luciferase pro µg Protein umgerechnet (Krougliak, V. & Graham, F. L. (1995) Hum. Gene Ther. 6, 1575-1586 und Franz, W. M. et al. (1993) Circ. Res. 73, 629-638).

Für die in vivo Studien wurden die Ratten 5 Tage nach Injektion dekapitiert. Zwölf verschiedene Gewebe (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Nieren, Quadriceps femoris, Gehirn) wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Gewebeproben gewogen, in

200 µl Lysepuffer (1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 100 mM Kaliumphosphat pH 7,8) aufgenommen, in einem Glashomogenisator aufgeschlossen und für 15 Minuten bei 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Luciferase-Bestimmung eingesetzt (Acsadi, G. et al. (1994) Hum. Mol. Gen. 3, 579-584 und Ausubel, F. M. (1989), supra). Hierzu wurden die Substrate Luciferin und ATP hinzugegeben und die Lichtemission, die proportional zu der Luciferaseaktivität ist, bei 560 nm photometrisch in einem Transilluminometer gemessen. Die Luciferaseaktivität wurde in "relative light units" (RLU)/mg Gewebe-Naßgewicht nach Abzug der Hintergrundsaktivität, die für die verschiedenen Gewebe in nicht-infizierten Tieren ermittelt wurde, angegeben.

4. β -Galaktosidase-Bestimmung

Die Herzen neonataler Ratten wurden in Stickstoff-gekühltem Isopentan eingefroren und bei -70 °C gelagert. Das Herzgewebe wurde in O. C. T. (Tissue Tek, Miles, USA) Einfriermedium eingebettet und 10 µm Gewebeschnitte mit einem Kryostat (Frigocut 2800 E, Leica) angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten in Lösung A fixiert (PBS, 0,2% (v/v) Glutaraldehyd, 5 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$), 3x10 Minuten mit Lösung B gewaschen (PBS, 0,01% (v/v) Natrium-Desoxycholat, 0,02% (v/v) Nonidet P40, 5 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$) und über Nacht bei 37 °C in Lösung C gefärbt (Lösung B + 1 mg/ml X-Gal, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$). Anschließend wurde einmal mit Lösung B und einmal mit destilliertem Wasser für 10 Minuten gewaschen. Eine schwache Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin sowie das Dehydrieren und Einbetten der Proben erfolgte nach Standardprotokollen (Gossler, A. & Zachgo, J. (1993) "Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras" in Joyner, A. L. (ed.) Gene Targeting, Oxford University Press, 181-225).

5. Nachweis adenoviraler DNA mit Hilfe der PCR-Methode

Parallel zu den Luciferase-Bestimmungen gemäß Beispiel 3 wurde die genomische DNA aus den Sedimenten der Gewebehomogenate der mit Adenoviren infizierten neonatalen Ratten unter Verwendung des QIAamp Tissue Kit (Fa. Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Jeweils zwei der mit Ad-Luc, Ad-RSV-Luc und Ad-mlcLuc infizierten Tiere wurden auf die Gewebeverteilung der injizierten Viren durch die PCR (Polymerasekettenreaktion) zum Nachweis der adenoviralen DNA untersucht (Zhang, W. W. (1995) *BioTechniques* 18, 444-447). Hierzu wurden 100 ng genomische DNA als Probe zusammen mit 40 ng der Oligonukleotide E2B-1 und E2B-2 und 1,25 U Taq Polymerase von Promega in einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Die Gelelektrophorese des spezifischen PCR Produktes ergab eine 860 bp Bande.

Die Sensitivität der PCR wurde in Vorversuchen bestimmt. Hierzu wurden 100 ng genomische DNA einer nicht infizierten Ratte mit abnehmenden Mengen AdDel324 DNA gemischt und in einer PCR-Reaktion als Probe eingesetzt. Um die Sensitivität des Nachweises der PCR zu erhöhen, wurden die PCR Produkte auf eine GeneScreenPlus Nylonmembran (NEN, Boston, Massachusetts) durch Kapillarblot transferiert und anschließend durch Southernblot-Hybridisierung nachgewiesen (Ausubel, F. M. et al. (1989), supra). Als Sonde wurde das durch PCR amplifizierte adenovirale 860 bp DNA-Fragment der Positivkontrolle eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel gereinigt und durch "random hexanucleotide prime" mit ³²P radioaktiv markiert und als Probe für die Hybridisierung verwendet. Die Sensitivität des PCR-Nachweises konnte auf diese Weise um den Faktor 10 bis 100 verbessert werden.

6. Infektion von Zelllinien (in vitro)

A10- (glatte Muskel-Zelllinie der Ratte), H9c2- ((Herzmyoblasten-Zelllinie der Ratte) und HeLa- (menschliche

Zervixkarzinom-Zelllinie) Zellen wurden in "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM), 293-Zellen in MEM komplementiert, mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Einen Tag vor der Infektion wurden 1×10^5 Zellen der etablierten Zelllinien H9c2, A10 und HeLa in Triplika auf "12 well" Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden in 0,2 ml des jeweiligen serumfreien Mediums, das die rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-RSVLuc, Ad-mlcLuc und Ad-smhLuc in einer "multiplicity of infection" (m. o. i.) von 10 enthielt inkubiert (10 Viren/Zelle). Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C mit leichtem Schwänken wurden alle 15 Minuten 2 ml des jeweiligen komplettierten Mediums zugegeben. Alle Infektionsexperimente wurden 4mal wiederholt. Drei Tage nach den Infektionen wurden die Luciferase-Aktivitäten, wie oben beschrieben, gemessen.

Die Ergebnisse der Experimente sind schematisch in der Abb. 3 dargestellt. Man erkennt, daß bei allen untersuchten Zelllinien die Luciferaseaktivität des Adenovirus Ad-mlcLuc geringer ist als die negative Kontrolle mit dem promotorlosen Adenovirus Ad-Luc. Ad-smhLuc zeigt in der HeLa-Zelllinie eine erhöhte Aktivität und Ad-rsvLuc zeigt als positive Kontrolle in allen untersuchten Zelllinien die höchste Luciferaseaktivität.

7. Infektion von primären Zellen in Gewebekultur (in vitro)

Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten von 2 bis 3 Tage alten Tieren wurden wie von Sen, A. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 19132-19136 beschrieben, präpariert und kultiviert. Einen Tag vor der Infektion wurden 2×10^5 frisch präparierte neonatale Kardiomyozyten in Triplika auf "12 well" Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden in 0,2 ml des jeweiligen serumfreien Mediums, das die rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-RSVLuc, Ad-mlcLuc und Ad-smhLuc in einer "multiplicity of infection" (m. o. i.) von 10 enthielt

inkubiert (10 Viren/Zelle). Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schwänken wurden alle 15 Minuten 2 ml des jeweiligen komplettierten Mediums zugegeben. Alle Infektionsexperimente wurden 4mal wiederholt. In analoger Weise wurden primäre neonatale und adulte glatte Muskelzellen der Ratte infiziert.

Die Ergebnisse der Experimente sind schematisch in der Abb. 4 dargestellt. Man erkennt, daß nur in neonatalen Kardiomyocyten die Luciferaseaktivität des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc höher ist als die negative Kontrolle mit dem Adenovirus Ad-Luc, jedoch geringer als die positive Kontrolle mit dem Adenovirus Ad-rsvLuc, aber 300-900mal höher als in glatten Gefäßmuskelzellen. Man erkennt ferner, daß die Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc 129mal höher ist als die von Ad-smmhcLuc. Daraus folgt, daß der mlc-2 Promotor in neonatalen Kardiomyozyten aktiv ist, während die erwartete Aktivität des smmhc-Promotors in neonatalen und adulten glatten Muskelzellen ausblieb.

8. Intracavitäre Injektion rekombinanter Adenoviren in die linke Herzhöhle von neonatalen Ratten

Alle Injektionen wurden an spezifisch pathogenfreien 2-3 Tage alten Sprague Dawley Ratten (CRWiga, Sulzfeld) durchgeführt. Vor den Injektionen wurden die neonatalen Ratten durch 3-5 minütiger Inhalation mit Methoxyfluran (Metofane, Jannssen GmbH) narkotisiert. 2×10^9 "plaque forming units" (p.f.u.) der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc wurden in einem Volumen von 20 µl mittels einer Tuberkulinspritze (27,5 gauge) injiziert. Die Injektion erfolgte durch direkte Punktion der Herzkammer durch den Brustkorb lateral im 4. Interkostalraum. Durch Aspiration von Herzblut wurde sichergestellt, daß die Nadelspitze intrakavitär positioniert war. Eine langsame Injektion der Viren (20 µl/min) wurde durch einen Aufsatz für Tuberkulinspritzen erreicht. Die Injektion der rekombinanten

Adenoviren in Quadriceps femoris wurde entsprechend durchgeführt.

Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität in zwölf verschiedenen Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) bestimmt. Die ermittelte Luciferaseaktivität in RLU/mg Gewebe wird in Abb. 5 zusammengefaßt. Adenovirus AD-mlcLuc, der den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor trägt, zeigte eine Luciferaseaktivität, die auf den Herzmuskel beschränkt blieb (Abb. 5c). Die Injektion der Positivkontrolle Ad-rsvLuc zeigte die höchste Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, im Herzen und eine starke Luciferaseaktivität in der Lunge, Thymus und Diaphragma (Abb. 5b). Im Ad-Luc injizierten Tier wurde eine geringe Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, Herz, Thymus und Diaphragma gemessen (Abb. 5a). Im Herzen war die Ad-mlcLuc induzierte Luciferaseaktivität 17 mal höher als die von Ad-Luc, während in allen anderen Geweben die Luciferaseaktivität von Ad-Luc und Ad-mlcLuc vergleichbar stark war. Damit wurde gezeigt, daß Ad-mlcLuc spezifisch im Herzen aktiv ist.

Die Verteilung infizierter Herzmuskelzellen nach Injektion von Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten wurde in Vorexperimenten durch die Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-rsv β gal zusätzlich überprüft. Das rekombinante Adenovirus Ad-rsv β gal exprimiert die β -Galaktosidase als Reportergen unter Kontrolle des "Rous Sarcoma Virus" (rsv) Promotors. Fünf Tage nach der Injektion erfolgte die Sektion des Tieres und die Expression der β -Galaktosidase wurde nach Färbung des Transgens bestimmt. In den histologischen Schnitten sind infizierte Zellen durch Blaufärbung des Kerns zu erkennen. Etwa die Hälfte der myokardialen β -Galaktoseaktivität zeigte sich im Bereich der Einstichstelle in die Herzkammer. Entlang des Kanals der Injektionsnadel fand sich in fast allen Kardiomyozyten β -Galaktosidaseaktivität (Abb. 6a), wohingegen im restlichen

Myokard die Anzahl der infizierten Kardiomyozyten gering war (Abb. 6b).

9. Injektion rekombinanter Adenoviren in die Oberschenkelmuskulatur neonataler Ratten

Um die Aktivität des mlc-2v Promotors im Skelettmuskel zu untersuchen, wurden 20 µl mit 2×10^9 "plaque forming units" (p.f.u.) der drei rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in den rechten Oberschenkelmuskel Quadriceps femoris neonataler Ratten injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Ad-Luc und Ad-mlcLuc zeigten vergleichbar geringe Luciferaseaktivitäten (RLU/mg Gewebe) im injizierten Muskel, während Ad-rsvLuc sehr stark aktiv war (Tab. 1). Die Luciferaseaktivität, erzielt durch Ad-mlcLuc, betrug 0,05% der Luciferaseaktivität von Ad-rsvLuc. Diese Daten zeigen, daß Ad-mlcLuc im Skelettmuskel nicht aktiv ist und bestätigen die Herzmuskel-spezifische Genexpression durch den rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc.

| | Ad-Luc | Ad-rsvLuc | Ad-mlcLuc |
|--------------------------|-----------|-------------|-----------|
| RLUx10 ⁻³ /mg | 3,4+/-1,2 | 5670+/-3239 | 2,8+/-1,8 |

Tab. 1

10. Nachweis adenoviraler DNA in Geweben nach Injektion rekombinanter Adenoviren in die Herzkammer

Um das Ausmaß der Infektion von Nicht-Herzgewebe nach Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer zu bestimmen, wurde die genomische DNA aus 12 Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps

femoris) isoliert und die Präsenz der adenoviralen DNA in diesen Geweben durch die PCR bestimmt. Es wurden die Gewebe von jeweils zwei mit Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc infizierten Tieren untersucht. In Vorexperimenten wurde die Sensitivität des Nachweises adenoviraler DNA bestimmt, indem 100 ng genomischer DNA von nicht infizierten Ratten mit abnehmenden Mengen adenoviraler DNA Addel324 (von 10 pg bis 0,1 fg) vermischt und anschließend mittels PCR untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, daß 10 fg der adenoviralen DNA Addel324 in 100 ng genomischer DNA nicht infizierter Tiere noch nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht 0,017 adenoviralen Genomen pro Zelle (Abb. 7A). In mit Adenovirus infizierten Tieren wurde die virale DNA regelmäßig im Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma und Leber nachgewiesen (Abb. 4B). Um die Sensitivität des Nachweises der adenoviralen DNA zu steigern, wurden die PCR-Produkte auf eine Nylon-Membran überführt und durch Southern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen. Dies zeigte, daß die adenovirale DNA in geringeren Mengen auch in den anderen Geweben mit geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren nachgewiesen werden kann. In Abb. 4C wird ein repräsentativer Southern-Blot für ein Ad-mlcLuc injiziertes Tier gezeigt.

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß die Genexpression des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc auf den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor und nicht auf eine lokal erhöhte Viruskonzentration zurückzuführen ist.

11. Vergleich der spezifischen Aktivität des mlc-Promotors mit dem α mhc-Promotor

Nach intrakavitärer Injektion von ca. 2×10^9 "plaque forming units" der rekombinanten Adenoviren Ad- α mhcLuc (Abb. 8A) und Ad-mlcLuc (Abb. 8B) in die linke Hauptkammer neonataler Ratten konnte für beide Adenoviren die höchste Luciferaseaktivität im Herzen nachgewiesen werden. Jedoch ist der rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc 3-4 mal aktiver im

Herzen als Ad-mhcLuc. Zudem ist der rekombinante Adenovirus Ad-mhcLuc in der Niere, der Milz, der Leber, der Diaphragma, der Lunge und dem Interkostalmuskel aktiver als Ad-mlcLuc. Daraus folgt, daß der mlc-2 Promotor im adenoviralen Vektorsystem die Expression der Luciferase wesentlich stärker auf das Herz beschränkt als der α mhc-Promotor und zusätzlich ist der mlc-2 Promotor im Herzen 3-4mal aktiver als der α mhc-Promotor.

12. Nachweis der Ventrikel-spezifischen Expression

2×10^9 "plaque forming units" der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, Ad-mhcLuc und Ad-Luc wurden in einem Volumen von 20-40 μ l in den linken Ventrikel neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. In vier unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, daß nur für den rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc eine auf den Ventrikel beschränkte Genexpression gemessen werden kann (Abb. 9). Das Verhältnis der Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc im Ventrikel zum Atrium betrug ca. 30, während es für alle anderen Viren das 1-2fache betrug (Abb. 9C).

Patentansprüche

1. Gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert.
2. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz vom Herzen eines Säugetiers, insbesondere vom Menschen oder von einem Nager, vor allem von einer Ratte abstammen.
3. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz die Nukleinsäuren von den Positionen von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -800, vor allem von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1600 und insbesondere von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -1800, vor allem von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2100 oder von ungefähr +18 bis -19 bis ungefähr -2700 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens umfassen.
4. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz das HF-1a Element, das HF-1b Element, das MLE1 Element und das HF-3 Element umfassen.
5. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz zusätzlich das E-Box Element und/oder das HF-2 Element umfassen.

6. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz zusätzlich die CSS Sequenz umfaßt.
7. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz eine DNA- oder RNA-Sequenz, vorzugsweise eine DNA-Sequenz ist.
8. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA- oder RNA-Sequenz in einem Virusvektor enthalten ist.
9. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA-Sequenz in einem Adenovirusvektor oder Adeno-assoziierten Virusvektor, vorzugsweise in einem Adenovirusvektor enthalten ist.
10. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Adenovirusvektor ein replikationsdefizienter Adenovirusvektor ist.
11. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Adeno-assoziierte Virusvektor ausschließlich aus zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.
12. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß das therapeutische Genprodukt ausgewählt ist aus Dystrophin, β -adrenergischer Rezeptor oder Stickstoffmonoxid-Synthase.
13. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt kodiert, eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine polyA Sequenz enthält.

14. Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäurekonstruktes gemäß einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte regulatorische Nukleinsäuresequenz funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden wird, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Nukleinsäuresequenz zusätzlich in einen Virusvektor gemäß einem der Ansprüche 8-11 kloniert wird und/oder mit Liposomen komplexiert wird.
16. Verwendung eines Nukleinsäurekonstruktes gemäß einem der Ansprüche 1-13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur gentherapeutischen Behandlung einer Herzerkrankung.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Herzerkrankung um die Herzinsuffizienz, dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie, Dystrophinopathie, Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose und/oder Restenose der Blutgefäße handelt.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Arzneimittel im wesentlichen in der Herzkammer wirkt.
19. Arzneimittel enthaltend ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 1-13 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

Zusammenfassung

Bei der Erfindung handelt es sich um ein gentherapeutisches Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine regulatorische Nukleinsäuresequenz vom 5'-Ende des Myosin-Leichte-Ketten-2 Gens (MLC-2) des Herzens, die funktionell mit einer Nukleinsäure verbunden ist, die für ein therapeutisch wirksames Genprodukt, für eine antisense Nukleinsäure oder für ein Ribozym kodiert, sowie um ein Verfahren zu dessen Herstellung und die Verwendung zur gentherapeutischen Behandlung von Herzerkrankungen.

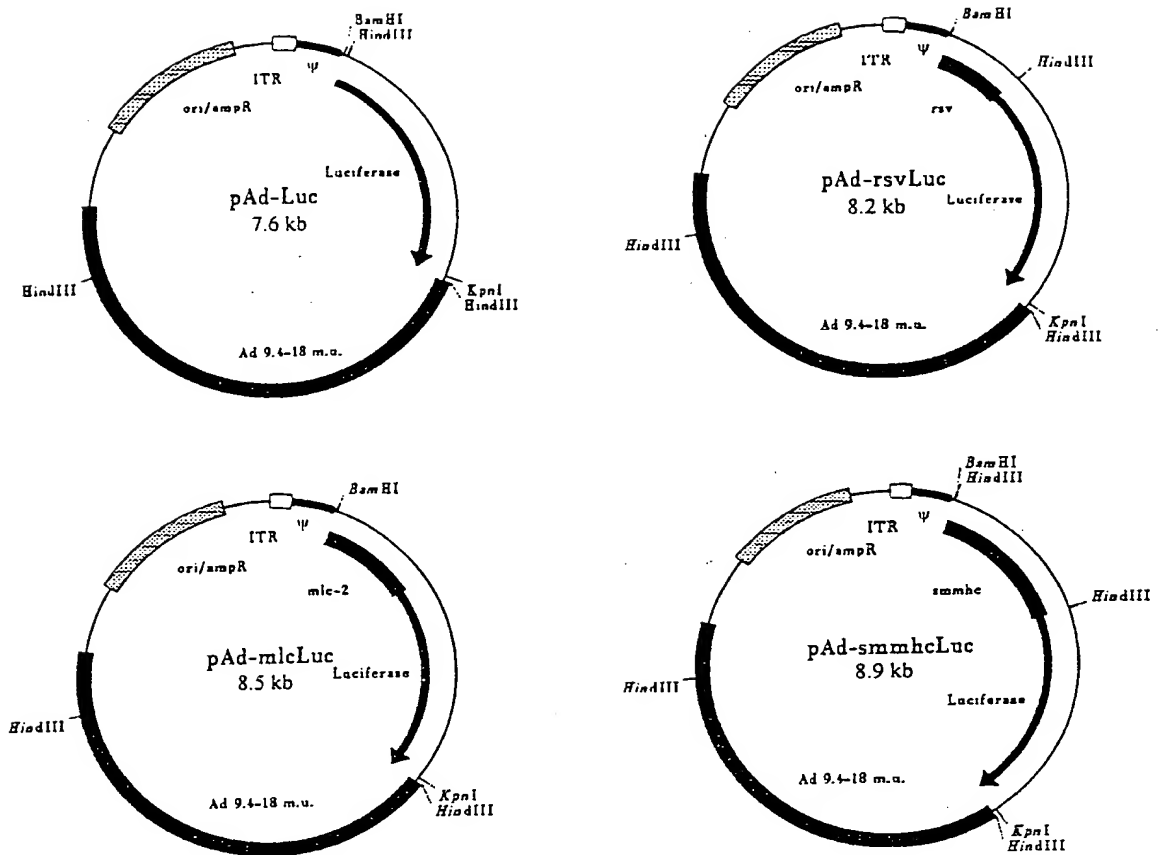
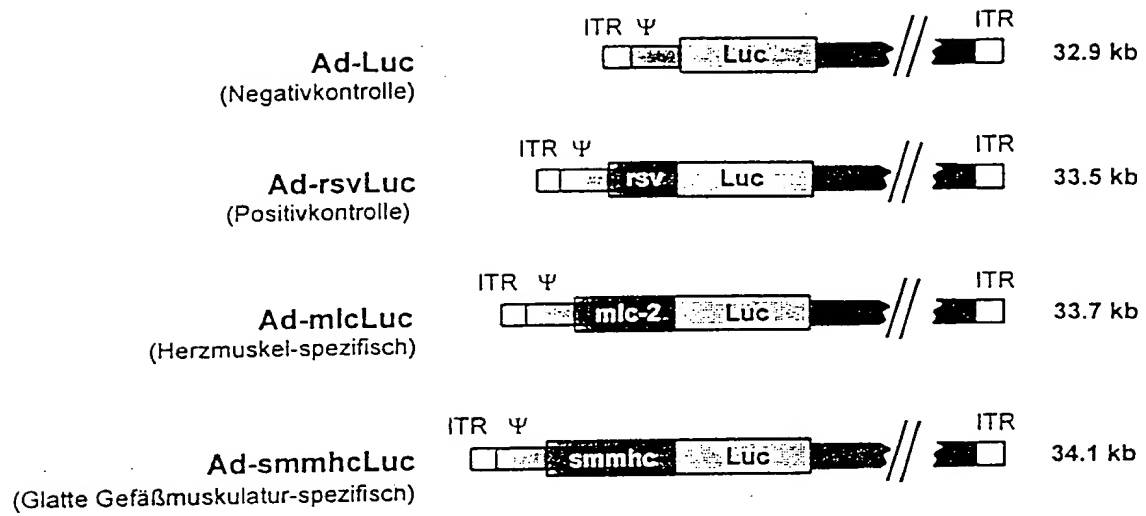


Abb. 1



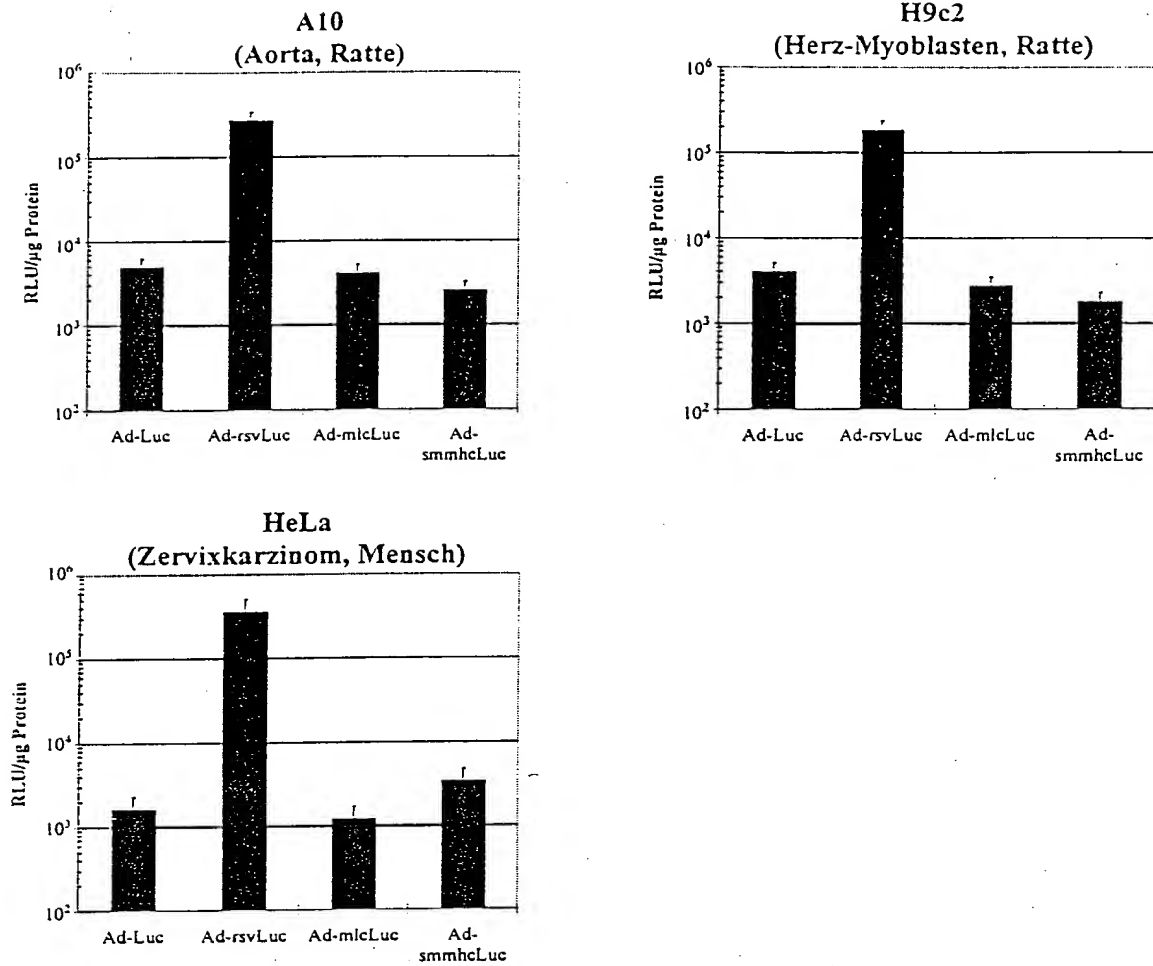
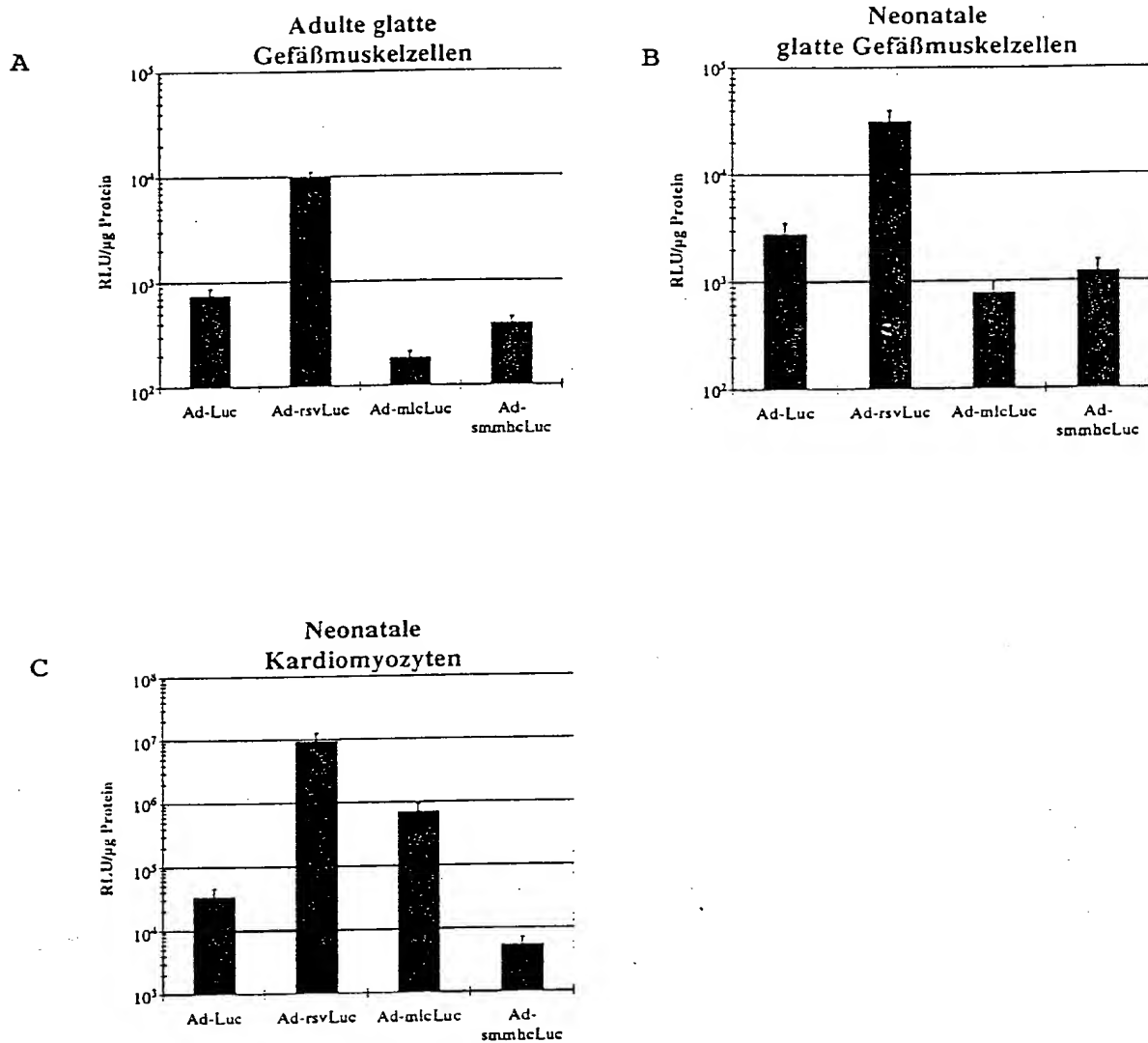
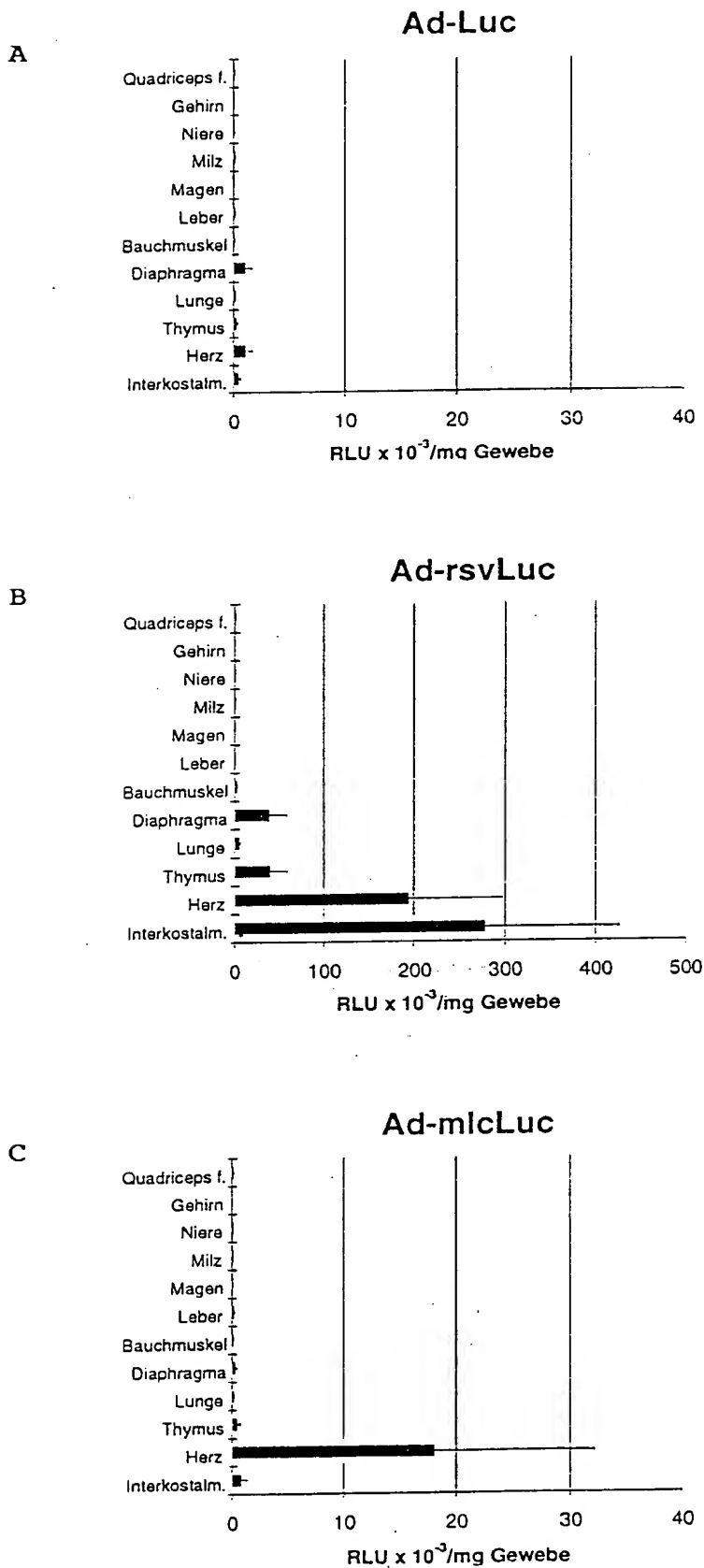


Abb. 3





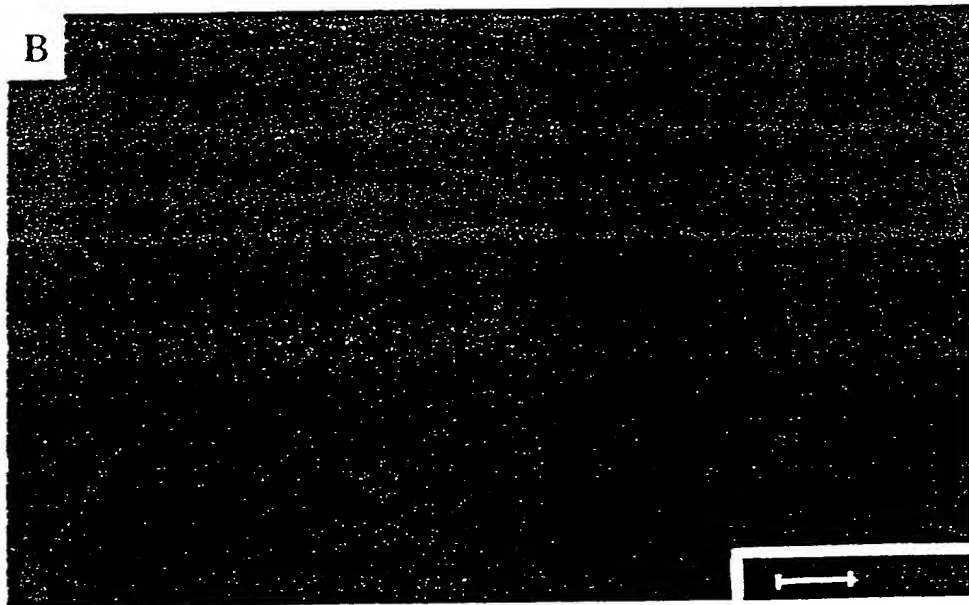
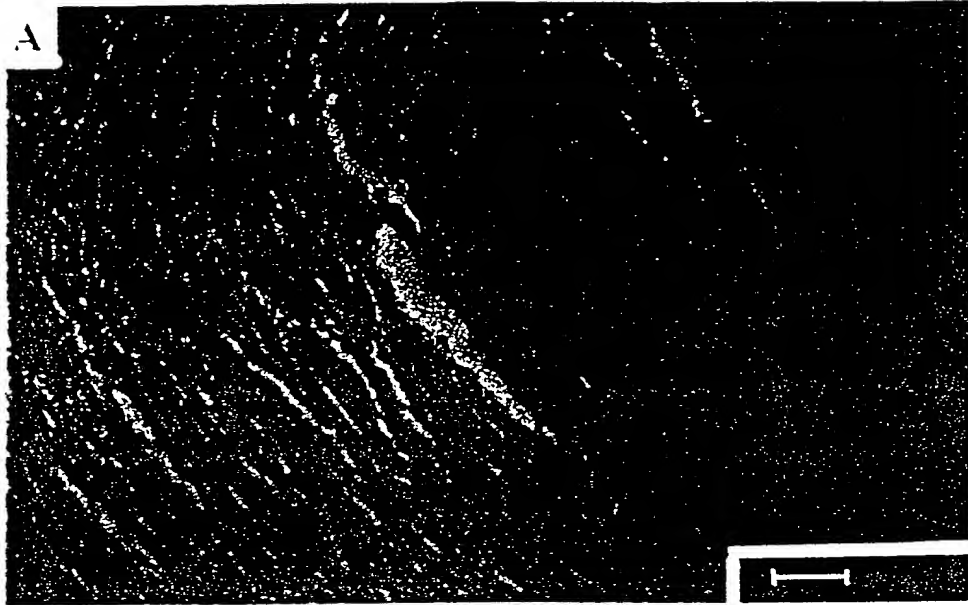


Abb. 6

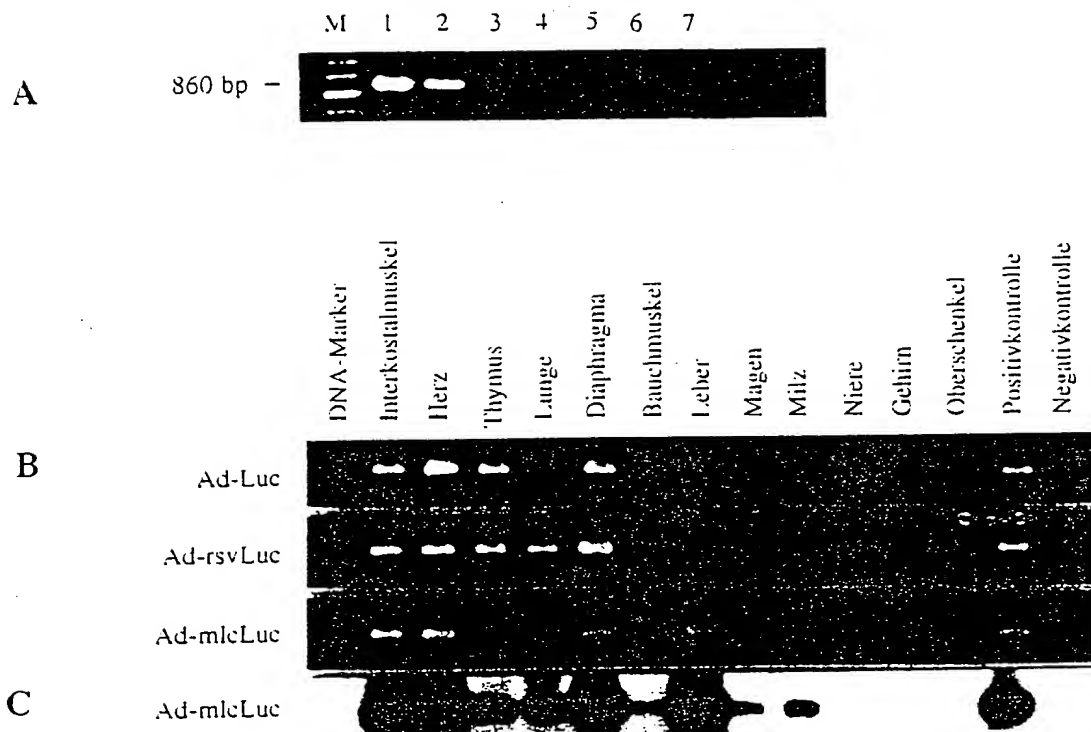
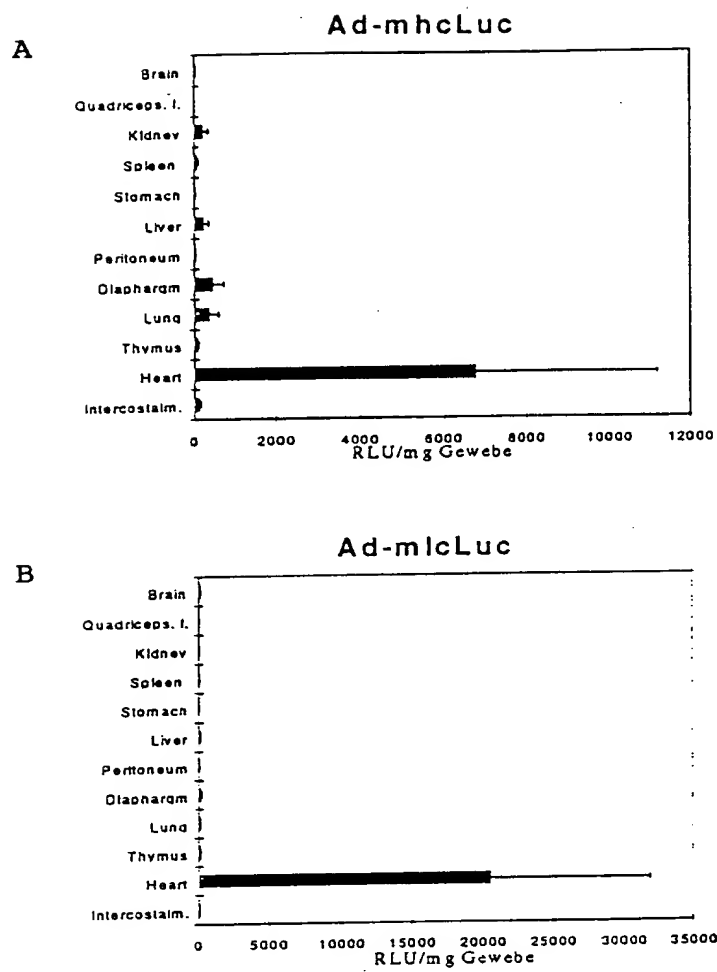
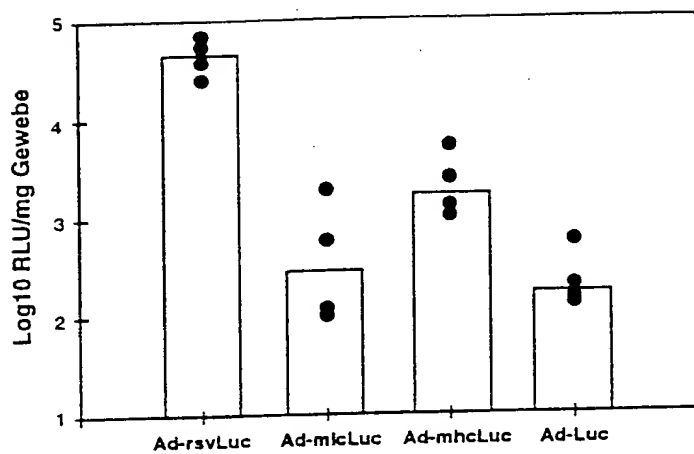


Abb. 7



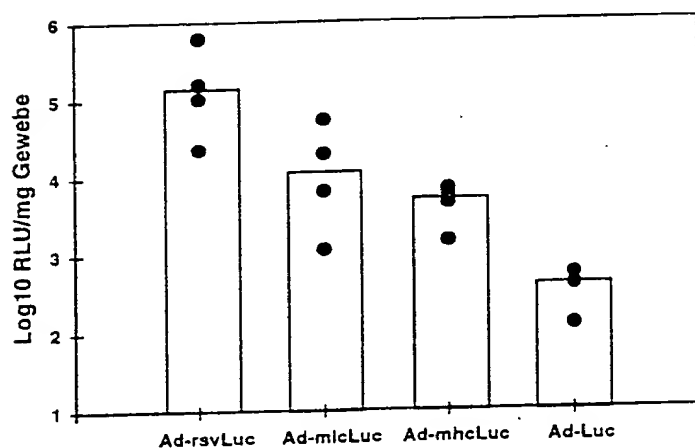
Atrium

A



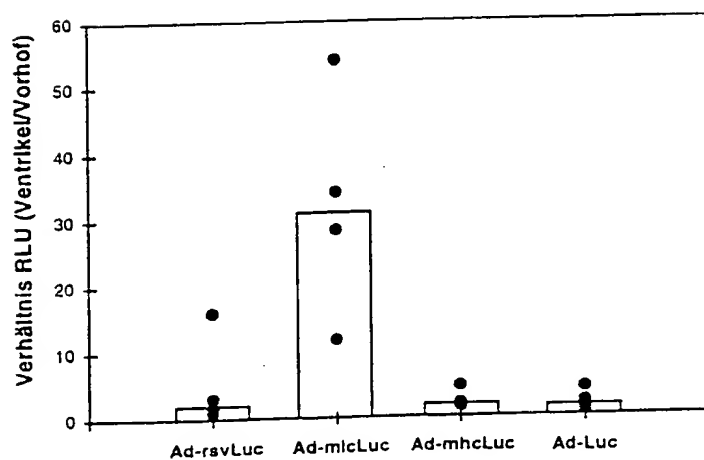
Ventrikel

B



Ventrikel/Atrium

C



| | |
|---|-----|
| GAAGTGAAAT CTGAATAATT TTGTGTTACT CATAGCGCGT AATATTTGTC | 50 |
| TAGGGCCGCG GGACTTTGAC CGTTTACGTG GAGACTCGCC CAGGTGTTTT | 100 |
| TCTCAGGTGT TTTCCGCGTT CCGGGTCAAA ... Verpackungsse- | 150 |
| quenz; BamHI KpnI | |
| GTCAGGGGGA TCCGGAATTC TTGAAGACGA AAGGGCCCGG TACCCAGGAC | 200 |
| TGATTCTCGG AAAGTTCTAG GCTGCAGAAA TCTCACACGC ACAAGAGTTT | 250 |
| GGAGTCACAG GATGGGTGTC CGCCAAGAGC CTAGGGACAG AACGTTGTCA | 300 |
| GCCCCTGTGC CCGGACCCTG TGGACTGTGA GAAGAGCAGA GTCCCACCCC | 350 |
| CAGGCCTTCT TAGACCCACC CCGGGTTTTT CCAGCATCCT TCCTGCAGGA | 400 |
| CCGGACCCCT GGCTGAAAGT ACAGAAACCC TAGAGTCTGC AGCCCATGTG | 450 |
| GCTGGGCCGC CATGTTTCCA GAATCCTCTG GTCTAAGGAT CCAGACCTCT | 500 |
| TACGGAGCCC AACAGCTCAA GGGACAGTTA GCATGTTTAT GTGTACTGGG | 550 |
| AGGAGCAGGA GCCAACAGAG GTCATGAAGA TCCACAGGGG CTCCGGTTCC | 600 |
| GAGGCCCTTG GGTTTTATCA CCAAATGTTT CCCACCCAGC AACATAAAAC | 650 |
| AGCTCCTCAG ACAGCGCAGT GGACCAGTGG <u>ACCACAGGGA CAGATCACCT</u> | 700 |
| Sequenz | |
| <u>CTGTGGGCCC AGACTCATAG TAACCTCTAA</u> CCTCAATCTC CAGCCTCCCA | 750 |
| CAGTCATTGT CGGTCACCTT GTTTCTCAGC CACCACACTT GGCAAGTCAC | 800 |
| GTGTGCCTCA ACACAATCTT CAGAAGCCAG GGGGATGGGG TTTTGTTTAA | 850 |
| CTGATGGGTG TTTTGTTTTG TTTTGTTTCA TTAAGTGTCA CGTAGCCAG | 900 |
| GCTAGCCTTG AACTCACTAT GTAGGCAAGC ATGACCATGA ACTTCTGATC | 950 |

| | |
|--|------|
| CTCCTTCCTC AGTGCCTGG GATAACAGGT GTGTGTCACT CCCTACCCTT | 1000 |
| CTAATAGCAA TATGTGGCCA CATGTTTGTG CCCCACAGGT TGAGACCATC | 1050 |
| TTGACCTGAG GAAGAAATAG CTAACACTCA CCTCCTGAAG GTTGCCTGGA | 1100 |
| TCTCGTCTTT GTCTTTCCAG CACTCAGGAG TGGGGGGGTC AGAAGTGCAA | 1150 |
| AGTCAGCCCC TGCTACATAA TGAGTTCAAG GCTCGCCTGG GCTACATGAG | 1200 |
| ACCATGCCTC AAAAAGAAAA GGAATTGGTA TAGTGACATA CTCTGGTCCT | 1250 |
| CCCAGTACTT AGGGACACAG AGGCCACTCC ACCACCATCT CCAGCAGCTG | 1300 |
| GCCTGCCTCC CCGAGCCTCG TTTATTTTCAT ATCAATGAGA TGGGGACCCA | 1350 |
| ACTGCTAAGG TGACCTTGCA CCCACGGGGT GACTGGAGAC TTGAGAGTGG | 1400 |
| AGGGTTTATC ATTTCTCCAG TCGGTCAGCA AGTGGTCGCC GCCAAGAAGG | 1450 |
| TTTTGAGTTC AAAGTAGAAG ATGGGACAGG GAGAGACCAG CGAGAAGACC | 1500 |
| CCACCCTGGA GCTGACTGTC CCTGTGCGGC TGGGTGGGGA CACAAAGCAG | 1550 |
| AGAAGCAGAG GCAGAGAACA AGGGTGGGTG ACATTTGAGC AAGGATGGGG | 1600 |
| GTGTGCCAGA GGCTGCCCAA GATGCATAGG TGCAAAGGCC CTGAGGTTCG | 1650 |
| AGGATGCCTG <i>p Ad-mC.Luc - Regulation. Site sequence</i> GATCCGGAAT CAAAGCTCAG GCTCCTCCCT CTCCTCCTC | 1700 |
| CTCCTCTGCC CCCTCCTCCT CCTCTGCCCC CTCTTCCTCC TCTGCCCCCT | 1750 |
| CTTCTTCCTC CTCCTCTTCC TCCTCCCCTC CTCATCTACC TCCTTCTCCT | 1800 |
| CCTCCTCCCC CTCCTCTTCC TCCTCTGCCC CCTCTTCCTC CTCCTCCTCT | 1850 |
| TCCTCCTCCT CTCCTCCTC CCCTCCTCAT CTACCTCCTT CTCCTCCTCC | 1900 |

TCCCCCTCCT CTCCTCCTC TGCCCCCTCT TCCTCCTCTG CCCCTCTTCC 1950
 TCCTCCTCCT CTCCTCCTC TGCCCCCTCC TCCCCCTCCT CTCCTCTTC 2000
 CTCCTCCCCCT CCTCATCTAC CTCCTTCTCT TCCTCCTCTT CTCCTCCTC 2050
 TTTCTCCTCC TCCTCCCTCT CCTCTTCCTC CTCCTCTTCT TTCTCCTCCT 2100
 CCTCTTCCTC CCCCTCCCCCT TCCTGGGTGA CTTTTCCCCA TTAGACAATG 2150
 GCAGGACCCA GAGCACAGAG CATCGTTCCC AGGCCAGGCC CCAGCCACTG 2200
 HF-3 Element MLE1 Element
 TCTCTTTAAC CTGAAGGCA TTTTGGGTC TCACGTGTCC ACCCAGGCGG 2250
 GTGTCGGACT TTGAACGGCT CTTACTTCAG AAGAACGGCA TGGGGTGGGG 2300
 E-Box HF-1a ; HF-
 GGGCTTAGGT GGCCTCTGCC TCACCTACAA CTGCCAAAAG TGGTCATGGG 2350
 1b Element
 GTTATTTTTA ACCCCAGGGA AGAGGTATTT ATTGTTCCAC AGCAGGGGCC 2400
 +1
 GGCCAGCAGG CTCCTTGAAT TCGACCCCTT CGAGCTTGGC ATTCCGGTAC 2450
 ! Luciferase-kodierende Sequenz ...
 TGTTGGTAAA ATGGAAGACG CCAAAAACAT AAAGAAAGGC CCGGCGCCAT 2500
 TCTATCCTCT AGAGGATGGA ACCGCTGGAG AGCAACTGCA TAAGGCTATG 2550
 AAGAGATACG CCCTGGTTCC TGGAACAATT GCTTTTACAG ATGCACATAT 2600
 CGAGGTGAAC ATCACGTTTCG CGGAATACTT CGAAATGTCC GTTTCGGTTG 2650
 GCAGAAGCTA TGAAACGATA TGGGCTGAAT ACAAATCACA GAATCGTCGT 2700
 ATGCAGTGAA AACTCTCTTT CAATTCTTTA TGCCGGTGTT GGGCCCGTTA 2750
 TTTATCCGGA GTTGCAGTTG CCGCCCGCCG AACA

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

ANMELDER:

- (A) NAME: Dr. Wolfgang-M. Franz
- (B) STRASSE: Fasanenring 15b
- (C) ORT: Gross Grönuu
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 23627

ANMELDETITEL:

Gentherapeutisches Nukleinsäurekon-
strukt, seine Herstellung und Verwen-
dung zur Behandlung von Herzerkrankun-
gen

ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PADAT Sequenzmodul Version 1.0

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2784 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|--|------|
| GAAGTGAAAT CTGAATAATT TTGTGTTACT CATAGCGCGT AATATTTGTC TAGGGCCGCG | 60 |
| GGACTTTGAC CGTTTACGTG GAGACTCGCC CAGGTGTTTT TCTCAGGTGT TTTCCGCGTT | 120 |
| CCGGGTCAAA GTTGGCGTTT TATTATTATA GTCAGGGGGA TCCGGAATTC TTGAAGACGA | 180 |
| AAGGGCCCGG TACCCAGGAC TGATTCTCGG AAAGTTCTAG GCTGCAGAAA TCTCACACGC | 240 |
| ACAAGAGTTT GGAGTCACAG GATGGGTGTC CGCCAAGAGC CTAGGGACAG AACGTTGTCA | 300 |
| CCCCCTGTGC CCGGACCCTG TGGACTGTGA GAAGAGCAGA GTCCCACCCC CAGGCCTTCT | 360 |
| TAGACCCACC CCGGGTTTTT CCAGCATCCT TCCTGCAGGA CCGGACCCCT GGCTGAAAGT | 420 |
| ACAGAAACCC TAGAGTCTGC AGCCCATGTG GCTGGGCCGC CATGTTTCCA GAATCCTCTG | 480 |
| GTCTAAGGAT CCAGACCTCT TACGGAGCCC AACAGCTCAA GGGACAGTTA GCATGTTTCAT | 540 |
| GTGTACTGGG AGGAGCAGGA GCCAACAGAG GTCATGAAGA TCCACAGGGG CTCCGGTTCC | 600 |
| GAGGCCCTTG GGTTTTATCA CCAAATGTTT CCCACCCAGC AACATAAAAC AGCTCCTCAG | 660 |
| ACAGCGCAGT GGACCAGTGG ACCACAGGGA CAGATCACCT CTGTGGGCCC AGACTCATAG | 720 |
| TAACCTCTAA CCTCAATCTC CAGCCTCCCA CAGTCATTGT CGGTCACCTT GTTTCTCAGC | 780 |
| CACCACACTT GGCAAGTCAC GTGTGCCTCA ACACAATCTT CAGAAGCCAG GGGGATGGGG | 840 |
| TTTTGTTTAA CTGATGGGTG TTTTGTTTTG TTTTGTTTCA TTAAGTGTCA CGTAGCCCAG | 900 |
| GCTAGCCTTG AACTCACTAT GTAGGCAAGC ATGACCATGA ACTTCTGATC CTCCTTCCTC | 960 |
| AGTGTCCTGG GATAACAGGT GTGTGTCACT CCCTACCCTT CTAATAGCAA TATGTGGCCA | 1020 |
| CATGTTTGTG CCCCACAGGT TGAGACCATC TTGACCTGAG GAAGAAATAG CTAACACTCA | 1080 |
| CCTCCTGAAG GTTGCCTGGA TCTCGTCTTT GTCTTTCCAG CACTCAGGAG TGGGGGGGTC | 1140 |
| AGAAGTGCAA AGTCAGCCCC TGCTACATAA TGAGTTCAAG GCTCGCCTGG GCTACATGAG | 1200 |
| ACCATGCCTC AAAAAGAAAA GGAATTGGTA TAGTGACATA CTCTGGTCCT CCCAGTACTT | 1260 |
| AGGGACACAG AGGCCACTCC ACCACCATCT CCAGCAGCTG GCCTGCCTCC CCGAGCCTCG | 1320 |
| TTTATTTTCAT ATCAATGAGA TGGGGACCCA ACTGCTAAGG TGACCTTGCA CCCACGGGGT | 1380 |
| GACTGGAGAC TTGAGAGTGG AGGGTTTATC ATTTCTCCAG TCGGTCAGCA AGTGGTCGCC | 1440 |
| GCCAAGAAGG TTTTGAGTTC AAAGTAGAAG ATGGGACAGG GAGAGACCAG CGAGAAGACC | 1500 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| CCACCCTGGA | GCTGACTGTC | CCTGTGCGGC | TGGGTGGGGA | CACAAAGCAG | AGAAGCAGAG | 1560 |
| GCAGAGAACA | AGGGTGGGTG | ACATTTGAGC | AAGGATGGGG | GTGTGCCAGA | GGCTGCCCAA | 1620 |
| GATGCATAGG | TGCAAAGGCC | CTGAGGTTCG | AGGATGCCTG | GATCCGGAAT | CAAAGCTCAG | 1680 |
| GCTCCTCCCT | CTTCCTCCTC | CTCCTCTGCC | CCCTCCTCCT | CCTCTGCCCC | CTCTTCCTCC | 1740 |
| TCTGCCCCCT | CTTCTTCCTC | CTCCTCTTCC | TCCTCCCCTC | CTCATCTACC | TCCTTCTCCT | 1800 |
| CCTCCTCCCC | CTCCTCTTCC | TCCTCTGCCC | CCTCTTCCTC | CTCCTCCTCT | TCCTCCTCCT | 1860 |
| CTTCCTCCTC | CCCTCCTCAT | CTACCTCCTT | CTCCTCCTCC | TCCCCCTCCT | CTTCCTCCTC | 1920 |
| TGCCCCCTCT | TCCTCCTCTG | CCCCTCTTCC | TCCTCCTCCT | CTTCCTCCTC | TGCCCCCTCC | 1980 |
| TCCCCCTCCT | CTTCCTCTTC | CTCCTCCCCT | CCTCATCTAC | CTCCTTCTCT | TCCTCCTCTT | 2040 |
| CTTCCTCCTC | TTTCTCCTCC | TCCTCCCTCT | CCTCTTCCTC | CTCCTCTTCT | TTCTCCTCCT | 2100 |
| CCTCTTCCTC | CCCCTCCCCT | TCCTGGGTTA | CTTTTCCCCA | TTAGACAATG | GCAGGACCCA | 2160 |
| GAGCACAGAG | CATCGTTCCC | AGGCCAGGCC | CCAGCCACTG | TCTCTTTAAC | CTTGAAGGCA | 2220 |
| TTTTTGGGTC | TCACGTGTCC | ACCCAGGCGG | GTGTCGGACT | TTGAACGGCT | CTTACTTCAG | 2280 |
| AAGAACGGCA | TGGGGTGGGG | GGGCTTAGGT | GGCCTCTGCC | TCACCTACAA | CTGCCAAAAG | 2340 |
| TGGTCATGGG | GTTATTTTTA | ACCCCAGGGA | AGAGGTATTT | ATTGTTCCAC | AGCAGGGGCC | 2400 |
| GGCCAGCAGG | CTCCTTGAAT | TCGACCCCTT | CGAGCTTGGC | ATTCCGGTAC | TGTTGGTAAA | 2460 |
| ATGGAAGACG | CCAAAAACAT | AAAGAAAGGC | CCGGCGCCAT | TCTATCCTCT | AGAGGATGGA | 2520 |
| ACCGCTGGAG | AGCAACTGCA | TAAGGCTATG | AAGAGATACG | CCCTGGTTCC | TGGAACAATT | 2580 |
| GCTTTTACAG | ATGCACATAT | CGAGGTGAAC | ATCACGTTCG | CGGAATACTT | CGAAATGTCC | 2640 |
| GTTTCGGTTG | GCAGAAGCTA | TGAAACGATA | TGGGCTGAAT | ACAAATCACA | GAATCGTCGT | 2700 |
| ATGCAGTGAA | AACTCTCTTT | CAATTCTTTA | TGCCGGTGTT | GGGCCCCTTA | TTTATCCGGA | 2760 |
| GTTGCAGTTG | CCGCCCCGCC | AACA | | | | 2784 |